



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
**Universidad del Perú. Decana de América**  
**Facultad de Medicina Veterinaria**  
**Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria**

**Evaluación *in vitro* de la respuesta leucocitaria de  
alpacas (*Vicugna pacos*) en presencia de antígenos  
clostridiales**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

Luis Angel TAMBILLO GUTIÉRREZ

Lima, Perú

2012

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la expresión de citoquinas proinflamatorias de los leucocitos circulantes de alpaca al enfrentarlos a extracto total del *C. perfringens* y sus toxinas, usando la técnica RT-PCR tiempo real. Se colectó sangre entera de la vena yugular de 10 animales: 5 alpacas hembras y 5 alpacas machos adultos. Los leucocitos fueron separados utilizando cloruro de amonio para lisar los eritrocitos seguidos de centrifugación. Los leucocitos aislados fueron cultivados a una concentración de 500 000 leucocitos /ml de medio MEM (Minimal Essencial Medium) en placas de cultivo de 12 pocillos y enfrentadas a extracto total de *C. perfringens* cultivados en caldo thioglicolato a concentraciones de 400µg/ml, 80µg/ml, 16µg/ml, 0.8µg/ml y 0.2µg/ml, para luego cuantificar la expresión de las citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  e IL-6 mediante la RT- PCR. Los resultados obtenidos demostraron que dosis bajas de extractos clostridiales (0.2 a 0.8 µg) son capaces de inducir expresiones de TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL1 $\beta$  desde las 12 a 24 horas de incubación, a diferencia de dosis altas en donde no sobrepasan la expresión de las citoquinas en leucocitos no estimulados (control). No se evidencia producción considerable de IL-6 hasta las 24 horas post exposición a extracto completo de *C. perfringens*. Estos resultados indican que el *C. perfringens* y sus toxinas a dosis bajas inducen la activación de los leucocitos circulatorios de alpacas produciendo la secreción de citoquinas proinflamatorias.

**Palabras clave:** *Camélido, enterotoxemia, citocinas, RT-PCR.*

## ABSTRACT

The objective of this study was evaluate how respond circulating leukocytes of alpacas confronting with total extract of *C. perfringens* and their toxins using the real time RT-PCR technique. Whole blood was collected of the jugular vein of 10 animals: 5 females and 5 males adult alpacas. The leukocytes were separated using ammonium chloride to lyse erythrocytes followed by centrifugation. These were cultured at a concentration of 500 000 cells / ml MEM medium (Minimal Essential Medium) in culture dishes of 12 wells and confronted to total extract of *C. perfringens* grown in thioglicolato broth at concentrations of 400µg/ml, 80µg/ml, 16µg/ml, 0.8µg/ml and 0.2µg/ml then quantify the expression of cytokines TNFα, IL-1α, IL-1β and IL-6 by RT-PCR. The results showed that low doses of clostridial extracts (0.2 to 0.8 mg) are capable of inducing expression of TNFα, IL-1α and IL-1β from 12 to 24 hours of incubation, unlike where high dosages do not exceed the expression of cytokines in unstimulated leukocytes (control). No evidence considerable production of IL-6 to 24 hours post exposure to whole extract of *C. perfringens*. These results indicate that *C. perfringens* and their toxins at low doses induce activation of leukocytes producing alpaca circulatory proinflammatory cytokine secretion.

**Keywords:** *Camels, enterotoxemia, cytokines, RT-PCR.*